

INTRODUCTION GENERALE

I.1 Protein folding problem : qu'est-ce-que c'est et en quoi est il important ?	1
I.2 Le repliement des protéines in vitro : hypothèses de résolutions	2
I.3 La réaction de repliement.	7
I.4 Caractéristiques de l'état natif	8
I.5 Caractéristiques de l'état dénaturé	12
I.5.1 Obtention des états dénaturés	15
I.6 L'étape de transition.	16
I.7 Existence des intermédiaires dans les trajectoires de repliement.	17
I.7.1 Rôle des états intermédiaires.	18
I.8 Les étapes initiales du repliement	19
I.9 Technique biophysique utilisé pour étudier le repliement des protéines.	23
I.10 Intérêt de la diffusion des neutrons et des rayons X dans les études sur le repliement des protéines.	24
I.11 La Dynamique des protéines	26
I.11.1 Dynamique des états dénaturés des protéines.	28
I.12 Objectifs de la Thèse.	31
I.13 La néocarzinostatine	32
I.13.1 La structure tridimensionnelle.	33
I.13.2 Protéines à "repliement des immunoglobulines"	35
I.14 Plan de travail.	40

CHAPITRE I

Introduction aux spectroscopies optiques et à la diffusion des neutrons et des rayons X

1.1 Les spectroscopies optiques	42
1.1.1 La fluorescence.	43
1.1.2 Dichroïsme circulaire	44
1.1.3 Analyse thermodynamique des résultats	45
1.2 La microcalorimétrie différentielle par balayage	48
1.2.1 Principe de la technique	48
1.2.2 Enthalpie de van't Hoff	50
1.3 Les techniques de diffusion	52
1.3.1. Principe d'une expérience de diffusion	52
1.3.2 Diffusion des neutrons	54
1.3.3.2 Diffusion cohérente et incohérente.	55
1.3.2.2 Intensité diffusée et facteurs de structure	57
1.3.2.3 La diffusion aux petits angles	59
1.3.2.4 Diffusion incohérente inélastique des neutrons.	60
<i>Fonction d'autocorrelation.</i>	61
1.3.3 Diffusion des rayons X	62
1.3.4 Formalisme de la diffusion aux petits angles	64
1.3.4.1 Diffusion par une solution idéale de macromolécules identiques	64
1.3.4.2 Diffusion par un mélange de macromolécules identiques en solution idéale	66
1.3.4.3 Facteurs de forme des chaînes polymériques	68
1.3.4.4 Représentation de kratky	72
1.3.4.5 Effet des interactions	73
1.2.5 Diffusion quasi-élastique de lumière	76

CHAPITRE II

Protocoles expérimentaux

2.1 Préparation des échantillons de néocarzinostatine	79
2.1.1 Expression de la protéine	79
2.1.2 Purification de la protéine.	79
2.1.3 Electrophorèse en condition dénaturante	80
2.1.4 Mesure de la concentration de la NCS	81
2.1.5 Préparation des échantillons pour les expériences	81
<i>Préparation dans l'eau légère</i>	81
<i>Préparation dans l'eau lourde</i>	82
2.2 Méthodes expérimentales	83
2.2.1 Fluorescence	83
2.2.2 Dichroïsme circulaire	84
2.2.3 Calorimétrie	85
2.2.4 Appareillage	85
2.2.4.1 Conditions expérimentales	85
2.2.4.2 Traitement des données expérimentales	86
2.2.5 Diffusion des rayons X aux petits angles	86
2.2.5.1 Appareillage	86
2.2.5.2 Conditions expérimentales	88
2.2.5.3 Traitement des données expérimentales	88
2.2.6 Diffusion de neutrons aux petits angles	90
2.2.6.1 Appareillage	90
2.2.6.2 Conditions expérimentales	92
2.2.6.3 Traitement de données expérimentales	92
<i>Expression de l'Intensité diffusée</i>	93
<i>Traitement des spectres bruts</i>	94
<i>Calibration absolue</i>	94
<i>Bruit de fond incohérent.</i>	95
2.2.7 Diffusion quasi élastique de la lumière	95

CHAPITRE III

Caractérisation des formes native et dénaturée de la néocarzinostatine

3.1 La NCS à l'état natif	98
3.1.1 Détermination du rayon de giration et du second coefficient du viriel	98
3.1.1.1 Expériences de neutrons	98
3.1.1.2 Expériences de rayons X.	101
3.1.2 Propriétés dichroïques	105
3.1.3 Rayon hydrodynamique en fonction du pH.	106
3.2 La NCS totalement dépliée	107
3.2.1 La chaleur spécifique	108
3.2.2 Rayon de giration et second coefficient du viriel	109
3.2.3 Longueur de contour et longueur statistique	113
3.2.3.1 Facteur de forme de Sharp et Bloomfield pour une chaîne idéale	114
3.2.3.2 Facteur de forme de Pedersen et Shurtenberger	117
3.3 Conclusions	118

CHAPITRE IV

Etude des états intermédiaires de repliement

4.1 Transition de dénaturation en fonction de la température	123
4.1.1. La thermodynamique	123
4.1.2 Variation de la structure secondaire et tertiaire en fonction de la température.	129
4.1.3. Changement de conformation suivie par diffusion aux petits angles des rayons X.	132
4.1.3.2 Fonction de distribution des distances	139
4.1.3.3 Représentation de Kratky des courbes de diffusion	142
4.1.4 Mise en évidence des états intermédiaires de repliement de la transition en fonction de la température	145
4.1.4.1 théorie de la méthode SVD	145
4.1.4.2 Résultats	149
4.2 Transition de dénaturation en fonction du Chlorure de guanidinium	154
4.2.1. Variation de la structure secondaire et tertiaire en fonction du chlorure de guanidinium	154
4.2.2 Détermination du rayon de giration par diffusion aux petits angles des neutrons.	156
4.2.3 Mise en évidence des états intermédiaires de repliement dans la transition en fonction du chlorure de guanidinium.	159
4.2.4 Etude thermodynamique	161
4.3 Conclusions	166

CHAPITRE V

Dynamique d'une protéine dénaturée

5.1. Matériel et méthodes	174
5.1.1. Préparation des échantillons	174
5.1.2. Diffusion quasi-élastique de neutrons	174
5.1.2.1. Conditions expérimentales	174
5.1.2.2. Traitement des données	175
5.1.2.3. Fonction de résolution expérimentale	180
5.2. Analyse des spectres de diffusion quasi-élastique.	181
5.2.1. Description du facteur de structure dynamique incohérent dans le cas d'une seule espèce globulaire	181
5.2.1.1. Diffusion quasi-élastique	181
5.2.1.2. Mouvements d' ensemble de la protéine	181
5.2.1.3. Mouvements internes de la protéine	183
5.2.1.4. Expression finale du facteur de structure dynamique incohérent	183
5.2.2. Description des différents types de diffusion confinée	184
5.2.3. Description du facteur de structure dynamique incohérent en présence d' espèces non globulaires.	186
5.3 Résultats	190
5.3.1. Diffusion Brownienne	190
5.3.2. Le pseudo-EISF	194
<i>Diffusion confinée dans un sphère.</i>	195
<i>Sauts entre trois sites</i>	197
5.3.3 Largeur quasi-élastique	199
5.3.4. Facteur de Debye-Waller	200
5.4 Discussion et conclusions	202

CONCLUSIONS GENERALES	210
ANNEXE	217
BIBLIOGRAPHIE.	223